



(19)

JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2000199855 A**

(43) Date of publication of application: **18.07.00**

(51) Int. Cl.

G02B 21/00
G02B 21/18

(21) Application number: **11072544**

(22) Date of filing: **17.03.99**

(30) Priority: **02.11.99 JP 10312088**

(71) Applicant: **OLYMPUS OPTICAL CO LTD**

(72) Inventor: **YOKOI EIJI**

(54) SCANNING TYPE OPTICAL MICROSCOPIC DEVICE

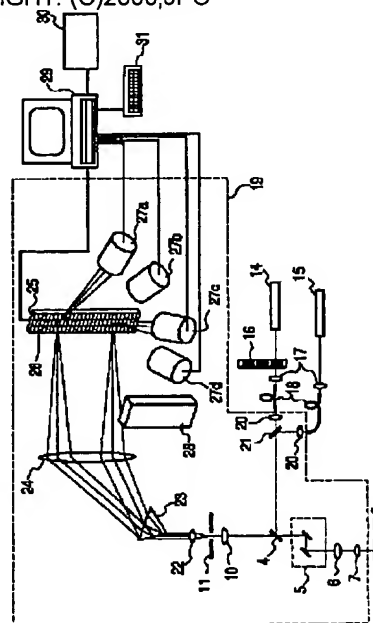
(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a scanning type optical microscopic device capable of acquiring the multiply stimulated fluorescent image of a multiply dyed sample at high S/N without using an optical filter and without changing the constitution of the device for various kinds of combination of stimulating wavelength and a fluorescent dyestuff with simple constitution which does not need a mechanical driving part requiring high positional reproduction accuracy.

SOLUTION: This device is equipped with laser beam sources 14 and 15, an objective lens 7, an X-Y scanning optical system 5, an image-formation lens 10, a confocal diaphragm 11 arranged at the focal position of the lens 10, photodetecting devices 27a to 27d, a prism 23 spatially spectrally splitting luminous flux passing through the diaphragm 11, and a mirror array 25 arrayed at least in the spectrally split direction of the luminous flux and receiving one part of the spectrally split luminous flux and deflecting it toward any of plural

photodetecting devices. Each micro optical mirror element 26 has plural deflecting angles to make the devices 27a to 27d selectively receive the luminous flux so as to optionally select one of plural deflecting angles.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-199855

(P2000-199855A)

(43) 公開日 平成12年7月18日 (2000.7.18)

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I

サーチワード(参考)

G 0 2 B 21/00

G 0 2 B 21/00

2 H 0 5 2

21/18

21/18

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平11-72544

(22) 出願日 平成11年3月17日 (1999.3.17)

(31) 優先権主張番号 特願平10-312088

(32) 優先日 平成10年11月2日 (1998.11.2)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72) 発明者 横井 英司

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ

ンパス光学工業株式会社内

(74) 代理人 100065824

弁理士 篠原 泰司 (外1名)

Pターム(参考) 2H052 AA05 AA08 AA09 AB24 AB25

AB30 AC04 AC12 AC15 AC26

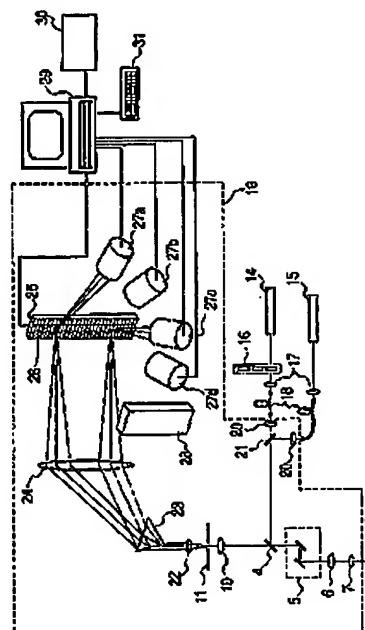
AC27 AC34 AF07

(54) 【発明の名称】 走査型光学顕微鏡装置

(57) 【要約】

【課題】 光学フィルターを用いることなく、また高度な位置再現精度を要する機械駆動部を必要としない簡易な構成で、励起波長や蛍光色素の様々な組み合わせに対しても装置構成を変えることなく、多重染色された標本の多重励起蛍光像を高いS/Nをもって取得できる走査型光学顕微鏡装置を提供する。

【解決手段】 レーザー光源14、15と、対物レンズ7と、X-Y走査光学系5と、結像レンズ10と、結像レンズ10の焦点位置に配置された共焦点絞り11と、光検出装置27a~27dと、共焦点絞り11を通過した光束を空間的にスペクトル分解するプリズム23と、少なくともスペクトル分解された方向に配列され且つスペクトル分解された光束の一部を受けてそれを前記複数の光検出装置の何れかに向けて偏向させるミラーレイ25とを備え、各々の微小光ミラー素子26は、複数の光検出装置27a~27dに選択的に光束を受光せしめる複数の偏向角度を有し、複数の偏向角度の1つを任意に選択できるようにした。



(2)

特開2000-199855

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 レーザー光源と、該レーザー光源から出射されたレーザービームを標本上に集光する対物レンズと、集光されたレーザースポットを前記標本に対して相対的に走査する走査手段と、前記標本から発する光を結像する結像光学系と、該結像光学系の焦点位置に配置された共焦点絞りと、該共焦点絞りを通った前記標本からの光を検出する複数の光検出装置とを備えたレーザー走査型光学顕微鏡装置において、

前記共焦点絞りを通過した光束を空間的にスペクトル分解するスペクトル分解手段と、少なくともスペクトル分解された方向に配列され且つ該スペクトル分解された光束の一部を受けてそれを前記複数の光検出装置の何れかに向けて偏向させる微小光偏向素子アレイとを備え、該各々の微小光偏向素子は、前記複数の光検出装置に選択的に光束を受光せしめる複数の偏向角度を有し、該複数の偏向角度の1つを任意に選択できるようにしたことを特徴とする走査型光学顕微鏡装置。

【請求項2】 以下に示す条件式を満足するようにしたことを特徴とする請求項1に記載の走査型光学顕微鏡装置。

$$d/\delta\lambda < 0.2$$

但し、 d は前記微小光偏向素子のスペクトル分解方向の大きさ、 $\delta\lambda$ は前記スペクトル分解手段によって分離された656.27nmと486.13nmの2波長が入射する前記微小光偏向素子アレイ上の入射位置間の距離を示す。

【請求項3】 励起用レーザービームの発振によって、該レーザービームの波長に対応する前記微小偏向素子の位置を検出し、この情報に基づいて前記微小偏向素子それぞれの光偏向角度を決定するようにしたことを特徴とする請求項1または2に記載の走査型光学顕微鏡装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は複数の蛍光を同時に検出できる走査型光学顕微鏡装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 一般に、蛍光検出装置は、医学および生物学をはじめ、その他の分野において生物組織や細胞上の蛍光標識を施したタンパク質や遺伝子等を検出する目的で広く使用されている。特に近年では、複数の蛍光色素で染色した標本を一度に観察する多重蛍光検出が、遺伝子の解析や、細胞内構造の解明に威力を発揮している。

【0003】 これら蛍光検出の有効な手段としては、レーザー走査型顕微鏡(LSM)が公知である。図13は蛍光用LSMの概略構成を示す図である。まず、このLSMでは、それぞれ異なる3種類の波長を発振する3つのレーザー発振器1a、1b、1cから出射されたレーザービームがレーザー結合用ダイクロイックミラー2

2

a、2bにより共通の光軸上に結合される。その後、レーザービームは、ビームエキスパンダー3を介して適当な大きさのビーム径に拡大されてダイクロイックミラー4で反射される。そして、ガルバノメーターミラー等のX-Y走査光学系5で偏向され、瞳リレーレンズ6、対物レンズ7を介して集光されたレーザービームは、標本8上に照射され、標本8をレーザースポットで走査することになる。

【0004】 レーザービームの照射により励起された標本8からの蛍光は、対物レンズ7からダイクロイックミラー4に至る経路を戻り、ダイクロイックミラー4を透過した後、分光用ダイクロイックミラー9aで分光される。ダイクロイックミラー9aで反射した一方の蛍光は結像レンズ10aで集光され、共焦点絞り11aを通過して吸収フィルター12aにて目的とする第1の蛍光以外の波長が吸収または反射された後、光検出器13aで光強度が検出される。共焦点絞り11aは、対物レンズ7の焦点位置と光学的に共役な位置に配置されており、レーザースポットで励起される蛍光以外の光を遮断する(共焦点絞り11b、11cも同様である)。このため、得られる画像は非常にコントラストが高いものとなる。また、標本8と対物レンズ7との距離を相対的に光軸方向に変えることによって3次元像を得ることが可能になる。

【0005】 他方、ダイクロイックミラー9aを透過した蛍光はダイクロイックミラー9bでさらに分光される。ダイクロイックミラー9bで反射された蛍光は結像レンズ10bで集光され共焦点絞り11bを通り、目的とする第2の蛍光のみを透過させる吸収フィルター12bを経て、光検出器13bにより光強度が検出される。また、ダイクロイックミラー9bを透過した蛍光はミラーで反射された後、結像レンズ10cで集光され共焦点絞り11cを通り、目的とする第3の蛍光のみを透過させる吸収フィルター12cを経て光検出器13cで検出される。

【0006】 ここに示したLSMでは、各レーザー発振器1a、1b、1cから発せられる3波長による3重励起蛍光の同時検出が可能である。レーザー波長の変更、蛍光色素の種類やレーザー発振器の数等、多重励起の状態が変わる毎に、ダイクロイックミラー4、分光用ダイクロイックミラー9a、9b、吸収フィルター12a、12b、12cはそれぞれ最適な分光特性を有するものに変更される。

【0007】 しかしながら光学フィルターを用いた従来の蛍光用LSMは次のような問題を有している。第1に、製造上の制限から光学フィルターは自在にその分光特性を決定できないので、蛍光光量やS/Nに限界があることが挙げられる。特に吸収フィルターでは励起光を完全に遮断する必要があるが、励起波長近傍の最も蛍光強度が強い波長領域の光量を損失しないように設計、製

(3)

特開2000-199855

3

造することができないのが現状である。第2に、励起光波長、蛍光色素毎に専用の高価な光学フィルターを用意しなければならず、様々な多重励起を想定した場合はフィルターの枚数の増大や、装置構成の複雑化、大型化が避けられない。第3に、図13に示した蛍光用LSMから明らかなように、多重蛍光の分光は複数の光学フィルターを経て行われるため、蛍光が光検出装置に到達するまでに相当の光量損失が生じることである。これらの問題はどれも励起光と蛍光の多重化が増すほど深刻になる。

【0008】これらの問題点を改善すべく、光学フィルターを使わずに複数の蛍光波長を選択、検出する数種の技術が提案されている。例えば、特表平9-502269号公報には、プリズム等でスペクトル分解された光束をスリット状のミラーで透過する第1の波長領域と反射する第2の波長領域に分光し、さらにスリット状ミラーおよび第2の波長領域を制限する第2のスリット位置とスリット幅を制御して、任意の2つの波長領域を選択、検出することができる分光装置および共焦点蛍光顕微鏡が開示されている。また、特開平8-43739号公報には、共焦点絞りを通過後の光束をグレーティングにより分光し、少なくとも1つのスリットによって波長領域および波長幅の選択を行い、各波長領域の光量をフォトディテクターで検出する走査型光学顕微鏡が開示されている。

【0009】これら2つの技術は共に、多重励起蛍光検出において、光学フィルターを使用することなく確実に励起波長を遮断し且つ十分な蛍光光量を確保してS/Nのよい蛍光検出が可能な走査型光学顕微鏡を提供する手段である。

【0010】また、光学フィルターを使わずに任意の波長選択ができる分光装置としては、特開平6-207853号公報に開示されたものがある。これは分散素子によって被検光束を空間的にスペクトル分解した後、分散スペクトルの少なくとも一部を変形可能なミラー装置に代表される空間光変調器で受け、所望のスペクトル領域のみを反射、若しくは透過せしめてそのエネルギー強度を検出するものである。一度、分散素子と空間光変調器、エネルギー検出器の関係が固定されると空間光変調器以外のあらゆる機械的動きを必要としないため、ここで生じる誤差をなくすることができる。また高精度な機械制御部が不要となる。なお、前記変形可能なミラー装置の詳細は米国特許5,061,049号公報に記載されている。具体的には、マイクロミラーの空間的なアレイからなり、各マイクロミラーは印加電圧の制御のみによって、あらかじめ選択された任意の角度に偏向が可能な素子である。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、前記特表平9-502269号公報に開示された走査型光学顕

4

微鏡では、波長選択を決定するスリットに機械的な動きが伴い、その検出部には非常に高度な制御構造が必要となるうえ、機械駆動部の振動や摩擦は測定時の再現性を失わせるため補正が必要となる。特に、スリット状のミラーと第2のスリットは分光の際にそれぞれが追動した動きを必要とするため、その制御の高精度化には困難を極める。さらに、同時検出すべき蛍光の種数が増えると、1つの分光手段では足りず、同様の波長分割手段を複数用いなければならず、光量損失と装置の複雑化を引き起こす。

【0012】また、特開平8-43739号公報に開示された分光装置および共焦点蛍光顕微鏡でも、前述の走査型光学顕微鏡と同様、機械駆動部の精度や再現性を保証する問題の他に、1つのフォトディテクターで検出できる波長帯域がグレーティング等のスペクトル分散手段とフォトディテクターの初期配置で決定されてしまうため、広波長帯域における波長選択の自由度が低く、多重励起蛍光検出における蛍光色素やレーザー波長の多様性には対応できない。

【0013】また、特開平6-207853号公報に開示された分光装置は、任意の波長領域の光量検出が可能なことから、1つの励起波長に対し1つの蛍光を取得する場合においては蛍光用LSMへの応用は可能である。しかしながら、励起波長や蛍光色素のあらゆる組み合わせに対応させて多重化した蛍光強度を同時に検出する場合に

は、容易に蛍光用LSMへ組み込むことはできない。【0014】本発明は上記のような従来技術の問題点に鑑みなされたものであり、その目的は、光学フィルターを用いることなく、また高度な位置再現精度を要する機械駆動部を必要としない簡易な構成で、励起波長や蛍光色素の様々な組み合わせに対しても装置構成を変えることなく、多重染色された標本の多重励起蛍光像を高いS/Nをもって検出できる走査型光学顕微鏡装置を提供することにある。

【0015】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため、本発明の走査型光学顕微鏡装置は、レーザー光源と、レーザー光源から出射されたレーザービームを標本上に集光する対物レンズと、集光されたレーザースポットを前記標本に対して相対的に走査する走査手段と、前記標本から発する光を結像する結像光学系と、結像光学系の焦点位置に配置された共焦点絞りと、共焦点絞りを通った前記標本からの光を検出する複数の光検出装置とを備えたレーザー走査型光学顕微鏡装置において、前記共焦点絞りを通過した光束を空間的にスペクトル分解するスペクトル分解手段と、少なくともスペクトル分解された方向に配列され且つスペクトル分解された光束の一部を受けてそれを前記複数の光検出装置の何れかに向けて偏向させる微小光偏向素子アレイとを備え、各々の微小光偏向素子は、前記複数の光検出装置に選択的に光束

特開2000-199855

(4)

5

を受光せしめる複数の偏向角度を有し、複数の偏向角度の1つを任意に選択できるようにしたことを特徴とする。

【0016】また、本発明の定査型光学顕微鏡装置は、以下に示す条件式を満足することを特徴とする。

$$d/\delta\lambda < 0.2$$

但し、 d は前記微小光偏向素子のスペクトル分解方向の大きさ、 $\delta\lambda$ は前記スペクトル分解手段によって分離された656.27nmと486.13nmの2波長が入射する前記微小光偏向素子アレイ上の入射位置間の距離を示す。

【0017】さらに、本発明の定査型光学顕微鏡装置は、励起用レーザービームの発振によって、レーザービームの波長に対応する前記微小偏向素子の位置を検出し、この情報に基づいて前記微小偏向素子それぞれの光偏向角度を決定するようにしたことを特徴とする。

【0018】

【発明の実施の形態】本発明の定査型光学顕微鏡装置は、レーザー光源と、レーザー光源から出射されたレーザービームを標本上に集光する対物レンズと、集光されたレーザースポットを前記標本に対して相対的に走査する走査手段と、前記標本から発する光を結像する結像光学系と、結像光学系の焦点位置に配置された共焦点絞りと、共焦点絞りを通過した前記標本からの光を検出する複数の光検出装置とを備えたレーザー走査型光学顕微鏡装置において、前記共焦点絞りを通過した光束を空間的にスペクトル分解するスペクトル分解手段と、少なくともスペクトル分解された方向に配列され且つスペクトル分解された光束の一部を受けてそれを前記複数の光検出装置の何れかに向けて偏向させる微小光偏向素子アレイとを備え、各々の微小光偏向素子は、前記複数の光検出装置に選択的に光束を受光せしめる複数の偏向角度を有し、複数の偏向角度の1つを任意に選択できるようにしたものである。

【0019】このように構成された本発明の装置では、前記共焦点絞りを通過した光束を空間的にスペクトル分解した後、スペクトル分解された光束を微小の波長幅毎に複数の光検出装置に受光せしめるように反射させ、多重染色された標本の蛍光波長域に応じて、光束を受光せしめる1つの光検出装置を任意に選択することができる。

【0020】前記共焦点絞りを透過する光束は標本で反射したレーザー波長と複数の蛍光波長を含む。これらの波長を空間的にスペクトル分解しその方向に配列された微小光偏向素子アレイへ投影すると、波長情報は微小光偏向素子の位置として変換される。ここで、複数の蛍光波長それぞれの位置に対応する微小光偏向素子は各蛍光を異なる光検出装置に受光させる角度に偏向する。また、同時に、励起波長に対応する微小光偏向素子は前記蛍光を検出する光検出装置に光が到達しない全く別の方

6

向に光束を偏向する。本発明の装置では、このような作用により、像のコントラスト低下を引き起こす励起波長を完全に排除して、多重化された蛍光を分離し、それぞれの蛍光を同時に検出することができる。

【0021】さらに、本発明の装置は、微小光偏向素子がそれぞれスペクトル分解された光束を複数の光検出装置に受光せしめる複数の偏向角度を有する構成を備え、レーザー波長や多重染色された蛍光色素の観察条件に対応して、光束を受光せしめる1つの光検出装置を任意に選択することで、光検出装置の数と同数のあらゆる種類の多重励起蛍光を分光し検出することができる。このとき、微小光偏向素子の光偏向角度をステップ状に変化させること以外に何ら機械駆動部を必要とせず、装置の変更、部品の入れ替えも不要である。また、微小光偏向素子の光偏向角度は電気的デジタル信号で制御可能であるため、装置自体に高い精度も複雑な構成も必要としない。

【0022】また、本発明の定査型光学顕微鏡装置では、前記共焦点絞りと前記スペクトル分解手段との間に、前記共焦点絞りを通過した光束を略平行光とするコリメートレンズと、前記スペクトル分解された光束の各スペクトル光を少なくともスペクトル分解の方向に集光させる集光光学系とを配置し、さらにその集光位置近傍に前記微小光偏向素子アレイを配置している。

【0023】共焦点絞りを通過した光束の拡がり、角度を波長の関数としてスペクトル分解する場合には大きな誤差を生じさせる。このため、スペクトル分解手段への入射光束はコリメートレンズによって略平行光とする必要がある。略平行光とされた光束はプリズムやグレーティング等のスペクトル分解手段を経て、角度を波長の関数としてスペクトル分解されるわけだが、平行光束が有限の太さを有する以上、微小光偏向素子アレイとスペクトル分解手段との距離を十分離さなければ微小光偏向素子アレイ上で異なる波長に重なりが生じ波長分解能が低下する。本発明では、前記スペクトル分解された光束を微小光偏向素子アレイ上に集光させる集光光学系を配置することで、微小光偏向素子アレイ上の位置を光線角度の関数である波長に1対1で対応させることができる。また、微小光偏向素子アレイとスペクトル分解手段との距離を短縮できるので装置の小型化も可能となる。

【0024】また、本発明の定査型光学顕微鏡装置では、前記微小光偏向素子アレイと前記複数の光検出装置との間に、少なくとも1つの正の屈折力を有する光学系を配置するとよい。微小光偏向素子アレイで反射された後の拡散光束径を正の屈折力を備えた光学系により縮小することで、検出すべき蛍光強度を損失することなく光検出装置へ伝達し、S/Nのよい光量検出が可能となる。

【0025】また、前記微小光偏向素子アレイを形成する微小光偏向素子において、それぞれ隣接する2つの微

(5)

特開2000-199855

7

小光偏向素子は、少なくとも1つの共通する前記光検出装置へ光束を受光せしめる偏向角を有している。励起波長と蛍光波長とを分離する場合、その境界波長の決定が蛍光像のS/Nに大きく影響する。どの微小光偏向素子で受光した光までを蛍光として光検出装置へ導くか、またどの微小光偏向素子で受光した光までを励起光として排除すればよいか、1素子単位の最適化を行うには、隣接する2つの微小光偏向素子は少なくとも1つの共通する光検出装置へ光束を受光せしめる反射角を有していなければならない。この構成をとることにより、境界波長の選択を前記微小光偏向素子1素子単位でコントロールし、レーザー強度、共焦点絞りの径、観察倍率、蛍光色素、染色の状態等で変化する観察条件に適合した最高のS/Nをもって蛍光検出することができる。

【0026】さらに、本発明の走査型光学顕微鏡装置は、次の条件式(1)を満足することが好ましい。

$$d/\delta\lambda < 0.2 \quad \cdots(1)$$

但し、dは前記微小光偏向素子のスペクトル分解方向の大きさ、 $\delta\lambda$ は前記スペクトル分解手段によって分離さ

$$(\lambda_m \cdot f_2) / (NA_1 \cdot \delta\lambda \cdot f_1) < 0.35 \quad \cdots(2)$$

但し、 λ_m は検出光の最大波長、 f_2 は前記コリメートレンズの焦点距離、 f_1 は前記集光光学系の焦点距離、 NA_1 は前記共焦点絞りを通過して前記コリメートレンズへ入射する光束の開口数を示す。

【0029】ここで、本発明の走査型光学顕微鏡装置における光学系の構成を図1に基づき説明する。共焦点絞り11を通過した光束はコリメートレンズ22で略平行光束とされ、スペクトル分解手段であるプリズム23および集光レンズ24を経て各スペクトル毎に微小光偏向素子アレイの一形態であるミラーアレイ25上に集光さ

$$P(\lambda_0) = (1.22 \cdot f_1 \cdot \lambda_0) / (NA_1 \cdot f_2) \quad \cdots(3)$$

このスポット径 $P(\lambda_0)$ とミラーアレイ25上の波長分解量 $\delta\lambda$ の比は、共焦点絞り11からミラーアレイ25に至る光学系の波長分解能を表すパラメータともいえる。もし $(\lambda_m \cdot f_2) / (NA_1 \cdot \delta\lambda \cdot f_1)$ の値が0.35以上になると、ミラーアレイ25上での連

$$(NA_1 \cdot f_1) / (f_2 \cdot \sin\theta_m) < 1 \quad \cdots(4)$$

但し、 θ_m は微小光偏向素子が有する最小光偏向角度を示す。

【0032】分離すべき異なる波長は、微小光偏向素子アレイによってそれぞれの光束を異なる方向に偏向させることで波長分離が達成されるわけであるが、偏向された光束の拡がり角があまりに大きいと、クロストークの発生で2つの蛍光若しくは励起光と蛍光とを完全に分離することができなくなる。条件式(4)の左辺は微小光偏向素子アレイに偏向された光束の拡がり角を特徴づける $(NA_1 \cdot f_1) / f_2$ と微小光偏向素子の最小光偏向角度 θ_m の正弦関数との比で表され、波長分離時のクロストークの度合いを示している。もし、条件式(4)の左辺 $(NA_1 \cdot f_1) / (f_2 \cdot \sin\theta_m)$ の値が1以

8

＊れた656.27nmと486.13nmの2波長が入射する前記微小光偏向素子アレイ上の入射位置間の距離を示す。

【0027】前記微小光偏向素子アレイ上にスペクトル分解された光束は、1つの微小光偏向素子を最小単位として分光される。このため、微小光偏向素子アレイ上での波長分離量、詳しくは、前記スペクトル分解手段によって分離された657.27nmと486.13nmの2波長が入射する前記微小光偏向素子アレイ上の入射位置間の距離 $\delta\lambda$ と、微小光偏向素子のスペクトル分解方向の大きさdとの相対的關係が顕微鏡本体の波長分解能を制限する。もし $d/\delta\lambda$ の値が0.2以上になると、顕微鏡での波長分解能が不十分となり、励起波長と共に多くの蛍光強度を無駄に分離するか、励起光を少なからず含んだ蛍光を検出するか何れかの原因でS/Nのよい画像を検出することが困難となる。

【0028】また、本発明の走査型光学顕微鏡装置は、次の条件式(2)を満足することが好ましい。

＊れる。なお、図中、 λ_0 、 λ_1 、 λ_2 はそれぞれ任意の3波長の光束を示している。

【0030】共焦点絞り11を通過した光束の広がりは、その拡がり角度の正弦関数である開口数 NA_1 として定義される。 NA_1 は図示しない標準から共焦点絞り11に至る光学系で特徴づけられる。ある波長 λ のミラーアレイ25上でのスポット径 $P(\lambda)$ は、ミラーアレイ25上に集光される光束の開口数である $(NA_1 \cdot f_1) / f_2$ と λ の関数として次式で表せる。

★続スペクトルは光学系によりばかれ、蛍光を励起光から分離するのに必要十分な波長分解能が得られず、S/Nのよい蛍光を検出することは困難となる。

【0031】さらに、本発明の走査型光学顕微鏡装置は、次の条件式(4)を満足することが好ましい。

上になれば、クロストークによりS/Nのよい蛍光を検出することは困難となる。

【0033】また、本発明の走査型光学顕微鏡装置は、前記各微小光偏向素子の角度を記憶するメモリー部と、レーザー波長、蛍光色素に対応する情報の入力を行う入力部と、それらの入力情報から記憶された各微小光偏向素子の光偏向状態を再現するコントローラ部を備えている。

【0034】多重蛍光検出において、使用されるレーザー発振器と蛍光色素の組み合わせは無数に存在する。この条件が変わる毎に各微小光偏向素子の光偏向角度を設定することは作業者に相当の苦痛を与える。本発明の装置によれば、多用するレーザーおよび蛍光色素や、1度

行った蛍光検出に対応する顕微鏡の状態を、入力部への簡単な入力によっていつでも再現することが可能であるため、測定時の煩雑な作業を軽減して快適な操作を保證する。また、測定ミスを減らし、強力なレーザービーム照射による標本へのダメージや退色を最小限に抑えることができる。

【0035】本発明の走査型光学顕微鏡装置では、励起用レーザービームの発振によって、レーザービームの波長に対応する前記微小光偏向素子の位置を検出し、その情報に基づいて前記微小光偏向素子それぞれの光偏向角度を決定する。

【0036】まず、本発明の装置では、励起用レーザービームを標本位置に置いたミラーで反射させる等、何らかの手段で前記共焦点絞りを通過させ、前記スペクトル分解手段を経て前記微小光偏向素子アレイへ導く。このとき、この微小光偏向素子アレイを形成する微小光偏向素子を1素子ずつ前記光検出装置の1つへ向けてレーザービームを反射し、これを受光した光検出装置が順にその光量を検出することで、励起用レーザービームの波長に対応する微小光偏向素子の位置を検出することができる。この情報に基づき微小光偏向素子それぞれの光偏向角度を決定すれば、レーザー波長の経時変化や環境変化に対する顕微鏡本体のキャリブレーションを行ったことになり、常に最高のS/Nをもって多重蛍光の検出が可能となる。また、レーザー発振機構と連動させることで、完全に自動化されたシステムが構築できる。

【0037】なお、本発明の走査型光学顕微鏡装置において、前記微小光偏向素子は微小ミラー素子であることが好ましい。

【0038】また、本発明の走査型光学顕微鏡装置は、蛍光を検出すると共に前記複数の光検出装置のうちの少なくとも1つの光検出装置によって励起波長の光強度を検出するようにしている。

【0039】蛍光染色を施した部分の位置の特定や時間的変化の様子を観察すると同時に細胞の輪郭形状を得る手段としては、蛍光観察と他の顕鏡法、例えば微分干渉法を組合せて幾つかの観点から解析を行うことが様々な分野で有効とされている。LSMにおいては、蛍光観察と同時に用いられる観察手法として標本の透過像を検出することが一般的である。しかしながら透過像の検出では、構成上の問題から共焦点検出を行うことは非常に困難である。そこで本発明では、前記微小光偏向素子アレイ上に分解されたスペクトルのうち、励起波長に対応する光束を少なくとも1つの光検出装置に向けて偏向し、この励起波長の光強度を検出して画像化すると同時に他の光検出装置で蛍光の検出を行うことにより、蛍光像と標本で反射、散乱した励起光による像の何れをも、同時に3次元情報として得ることが可能となる。又、蛍光と励起光の完全な波長分離が行えるという本発明の利点から、例えばコントラストのつきにくい干渉像を検出する

場合であっても、蛍光に影響されことなく非常にS/Nのよい画像を得ることができる。このように、本発明では標本に染色された蛍光情報とともに標本の位相に関する情報、例えば輪郭などを同時に且つ3次元的に解析することが可能となる。

【0040】また、本発明の走査型光学顕微鏡装置は、前記標本上に照射されるレーザービームを直線偏光とし、且つ前記微小光偏向素子アレイと前記励起波長の光強度を検出する光検出装置との間に偏光板を配置している。

【0041】前記反射光の共焦点検出法として、標本の複屈折性を検出できる偏光観察や、カバーガラスと標本との間で生じる干渉像を検出する所謂リフレクションコントラスト法が挙げられる。偏光観察では入射レーザービームを直線偏光として標本に入射させその反射光を入射レーザーの偏光方向と直交した偏光方向を有する偏光板を配置するという構成をとる。一方、該リフレクションコントラスト法では、レンズ表面で反射された入射レーザー光がフレアとなることを防ぐため、入射レーザービームを直線偏光として標本へ向けて入射させ、標本とフレアの原因となるレンズとの間にλ/4板を配置し、入射レーザービームの偏光方向と直交する偏光板でレンズによるフレアのみを除去するという構成がとられる。何れの場合も標本と検出装置の間に偏光板を必要とするが、蛍光と該励起光の同時検出を考えた場合、蛍光が偏光板を透過する構成では光量損失が大きく明るい像が得られない。そこで、本発明では、前記微小光偏向素子アレイと前記励起波長の光強度を検出する光検出装置との間に偏光板を配置したことにより、励起波長だけが偏光板を通過することになり、蛍光の光量は全くロスすることがないため、明るい蛍光と各種励起光による反射光の同時検出が可能となる。

【0042】また、本発明の走査型光学顕微鏡装置は、前記対物レンズと前記結像光学系との間にノマルスキープリズムを配置している。本発明をこのように構成することにより、蛍光をロスすることなく、微分干渉像と蛍光像の同時観察が可能となる。

【0043】また、本発明の走査型光学顕微鏡装置は、前記偏光板を励起波長の通過する光路へ着脱可能に配置している。

【0044】上述してきたように、前記微小光偏光子アレイと前記励起波長の光強度を検出する光検出装置との間に配置された偏光板は、偏光、微分干渉の各観察、及びフレア除去に必要不可欠であるが、多重蛍光観察を行う際には該光検出装置で蛍光を検出する場合も想定される。この場合、光路中に偏光板が配置されたままであると蛍光光量を大きくロスする結果となる。本発明では、前記偏光板を励起波長の通過する光路へ着脱可能に配置するため、たとえ該光検出装置で蛍光を検出する場合でも光量損失なく明るい像が得られる。

(7)

特開2000-199855

11

【0045】また、本発明の走査型光学顕微鏡装置は、前記複数の光検出装置のうちの少なくとも1つの光検出装置によって検出された励起波長の光強度を基に、他の光検出装置で検出された蛍光の光強度から励起光によるバックグラウンドノイズを除去するようになっている。

【0046】前記微小光偏向素子アレイに入射する光束は、素子間の隙間、表面の傷、素子のエッジ等で所望の方向以外へ散乱されることがある。特に標本で反射、散乱された励起光は蛍光の強度に比較して強いので、これらにより発生した散乱光が蛍光に混在してしまうとバックグラウンドノイズとなり像のコントラストを著しく低下させる。これを避けるには、蛍光像から励起光によるバックグラウンド像を取り除く必要があるが、バックグラウンドノイズとなる励起波長と蛍光波長の入り交じった光強度の情報からでは十分なノイズ除去を行うことは光学的に難しい。そこで本発明では、前記微小光偏向素子アレイへ入射する光束のうち励起波長のみを少なくとも1つの光検出装置へ向けて偏向させ、蛍光を含まない励起光単独の光強度を検出している。この情報から励起光によるバックグラウンドノイズを正確に見積もることが可能であり、他の光検出装置から得られた蛍光強度との適切な演算により、S/Nの高い画像を得ることができる。また、バックグラウンドノイズの検出と蛍光検出とを同時に行いながら処理を行うことによりノイズ成分の時間的変動に非常に強いという特徴を有し、安定してクリアな像を提供することができる。更に、本発明においては演算処理装置以外に装置構成を追加する必要はなく、装置の大型化、複雑化を伴わないという利点もある。

【0047】また、本発明の走査型光学顕微鏡装置は、前記複数の光検出装置のうちの少なくとも1つの光検出装置

$$I_{1n} = I_{f1} - (\alpha \cdot I_{ex} + \beta \cdot I_{1n}) \quad \dots(5)$$

但し、 I_{1n} は励起光によるバックグラウンドノイズ除去後の蛍光強度、 I_{f1} は検出された蛍光強度、 I_{ex} は前記複数の光検出装置のうちの少なくとも1つの光検出装置によって検出された励起波長の光強度、 I_{1n} は前記標本へ入射するレーザービームの強度、 α 、 β は前記走査型光学顕微鏡の装置状態に依存するパラメータを示す。また、 I_{1n0} 、 I_{f1} 、 I_{ex} 、 I_{1n} はそれぞれ標本とレーザースポットの相対位置に依存する関数である。

【0050】前記微小光偏向素子アレイで散乱したバックグラウンドノイズとして検出される励起光の光強度を更に※

$$I_{1n1} = \beta' \cdot I_{1n} \quad \dots(6)$$

と仮定できる。但し、 β' は定数である。一方、標本から到達した励起光によって生ずるノイズについてはその★

$$I_{1n01} = \alpha' \cdot (I_{ex} - \beta'' \cdot I_{1n1}) \quad \dots(7)$$

と表わすことができる。但し、 α' 、 β'' は定数である。上記 I_{1n1} と I_{1n01} の和が前記微小光偏向素子アレイ

$$(\alpha \cdot I_{ex} + \beta \cdot I_{1n}) \quad \dots(8)$$

と表わすことができる。よって、蛍光強度から上記値を差し引いた、上記の式(5)により、励起光によるバック

12

*装置によって検出された励起波長の光強度と、蛍光を検出するための他の光検出装置に受光される励起波長の光強度との比率をあらかじめ取得し、この比率に基づいて、蛍光の光強度から励起光ノイズを除去するようになっている。

【0048】バックグラウンドノイズとして検出される励起光の光強度は、レーザースポットと標本の相対位置に対して変動する。このような場合通常は、予め標本に励起光を照射してバックグラウンドノイズを計測するところであるが、蛍光染色された標本では蛍光が発生してしまい、励起光単独の光強度を検出することは非常に難しい。また、予め励起光単独の画像を得たとしても、画像処理を行う際に蛍光画像と励起光画像のわずかな位置ずれが逆に無視できない画像の劣化を招く可能性が大きく、その補正に更に付加的な処理を必要とする。そこで、本発明では、前記微小光偏向素子アレイに到達する標本から発生された励起光の光強度と、バックグラウンドノイズとなる散乱光との比率がほぼ一定に保たれていることに着目し、簡易な計算処理で精度良くバックグラウンドノイズを見積もり、除去することを可能とした。本手法は、検出された励起光強度に対する所定の比率を基にしてバックグラウンドノイズを見積もるため、バックグラウンドノイズが標本位置に依存する場合に非常に有効である。また、該比率に、光検出装置の入出力特性、標本の散乱角特性などを考慮した補正を行えば更に精度良くノイズ除去が可能となる。

【0049】また、本発明の走査型光学顕微鏡装置は、次の式(5)に基づいて蛍光信号に混在した励起光によるバックグラウンドノイズを除去するようになっている。

*正確に見積もるには、前記微小光偏向素子アレイに入射する励起光が、標本から到達したものか、装置内部から到達したものかを区別する必要がある。なぜなら、両者で前記微小光偏向素子アレイに入射する光束の開口数、強度分布が一致するとは限らず、この違いで前記微小光偏向素子アレイ上での散乱の度合いが異なると考えられるからである。まず、装置自体に起因する励起光ノイズについてはその強度を I_{1n1} とすると、標本へ入射するレーザービームの強度に比例するので、

★強度を I_{1n01} とすると、

☆レイで散乱した励起光によるバックグラウンドノイズであるので、定数をまとめると、

バックグラウンドノイズ除去後の蛍光強度を算出することができる。実際に上記定数 α 、 β は、入射レーザー強度の変化

13

や標本の有無など適当な状態での測定値から一意に求められる。このように本発明では共焦点絞りを通過する励起波長の発生源を標本と装置内部とに分離して考慮することで、非常に精度良くバックグラウンドノイズを見積もり、それを蛍光信号から除去することでS/Nの優れた蛍光像が得られる。また、上記の各式において、光検出装置の入出力特性、標本の散乱角特性などを考慮した補正を行えば更に精度良くノイズ除去が可能となる。

【0051】また、本発明の走査型光学顕微鏡装置は、前記走査型光学顕微鏡の装置状態、標本状態毎に前記パラメータ α 、 β の最適値を予め取得している。前記パラメータ α 、 β の最適値は、レーザー波長や使用する光学系の違いで異なった値が必要となる。実際の作業時には対物レンズ、レーザー波長を頻繁に切替えることもあり、それぞれにパラメータを最適化することは作業者に相当の負担を強いることになる。本発明では、多用する装置状態や、一度測定を行った装置の状態に対して前記パラメータ α 、 β をあらかじめ取得し、いつでも呼び出しできるようにしている。その結果、作業者の負担を軽減するとともに、快適な操作を保証することができ、また、測定ミスを減らし、強力なビーム照射による標本へのダメージや褪色を最小限に抑えることができる。

【0052】以下、図示した実施例に基づき本発明を詳細に説明する。なお、図10に示した従来例で用いられた部材と同一の部材については同符号を付している。

【0053】第1実施例

図2は本実施例にかかる走査型光学顕微鏡装置の構成を示す図である。本実施例の装置は、波長が488nm、568nm、647nmのレーザービームを同時発振するマルチラインKr-Arレーザー14と、波長が351nmのレーザービームを発振するArレーザー15を光源とする。各レーザーを出射したレーザービームはファイバーカップリングレンズ17を経てシングルモードファイバー18を通り走査型光学顕微鏡本体19へ導入される。マルチラインKr-Arレーザー14から発せられるレーザービームはレーザーラインフィルター16により励起波長を選択できる。

【0054】走査型光学顕微鏡本体19へ導入された各レーザービームは、ビームコリメートレンズ20で適切なビーム径を有する平行光束に変換され、ダイクロイックミラー21によってマルチラインKr-Arレーザー14からのレーザービームとArレーザー15からのレーザービームとが混合される。混合されたレーザービームは、励起用ダイクロイックミラー4で反射されてガルバノメータミラー等のX-Y走査光学系5で偏向され、瞳リレーレンズ6、対物レンズ7を介して、標本8上をレーザースポットによって走査することになる。

【0055】レーザービームの照射により励起された標本8からの蛍光は、対物レンズ7からダイクロイックミラー4に至る経路を戻り、ダイクロイックミラー4を透

(8)

特開2000-199855

14

過して結像レンズ10で集光され、共焦点絞り11を通過する。共焦点絞り11を通りコリメートレンズ22で平行光化された光束はプリズム23によって、その各レーザー波長に特有の角度に偏向されて出射され、さらに集光レンズ24を経てミラーアレイ25上に結像される。このとき、プリズム23からの各レーザー波長の出射角度はミラーアレイ25上の位置情報に置き換えられ、ミラーアレイ25を形成する微小ミラー素子26の位置がそのまま各レーザー波長に対応することになる。

【0056】なお、本実施例の装置では、プリズム23に代えてグレーティング、音響光学素子、ホログラフィック素子等のスペクトル分解素子を用いてもよい。また、集光レンズ24は、シリンダリカルレンズ等スペクトル分解方向に屈折力を有する光学系との置き換えも可能である。

【0057】各微小ミラー素子26はそこに入射した光束を光検出装置27a~27dへ向けて反射する偏向角と光トラップ28へ向けて反射する偏向角の計5つの選択可能な反射角度を有し、その角度選択は入力部31を経てコントローラ29からの電気信号で1素子単位で行うことができる。また、レーザーや蛍光色素に対応する何らかの入力を入力部31で行うと、コントローラ29がメモリ部30に記憶されている各微小ミラー素子26の角度を呼び出し、いつでも最適測定状態を再現できるようにになっている。また、所定の微小ミラー素子26の角度のみをメモリ部30に記憶させることもできる。

【0058】多重化された蛍光の分光は、レーザー波長に対応する微小ミラー素子26が入射光を光トラップ28へ向けて反射し、且つ蛍光波長に対応する微小ミラー素子26がその蛍光毎に別々の光検出装置27a~27dへ向けて反射させることで達成され、各光検出装置27a~27dでその強度が検出される。このように、本実施例の装置では、多重化される蛍光色素の数によらず1度の反射のみによって分光が行われるため、光量損失が極めて少なくなる。

【0059】ここで、励起波長と蛍光色素を変更する場合を考える。まず、351nm、488nm、568nm、647nmの4重励起波長に対して、それぞれの波長で励起される4つの蛍光色素が標本に染色されている場合、ミラーアレイ25の様子は、図3(a)に示すように、励起波長に対応する微小ミラー素子26e、26f、26g、26hはこの位置に集光された光を光トラップ28へ偏向する。一方、波長351nm、488nm、568nm、647nmで励起された蛍光はそれぞれの波長に対応する微小ミラー素子26a、26b、26c、26dによって、それぞれ光検出装置27a、27b、27c、27dへ向けて反射され、光強度が検出される。

【0060】次に、波長351nm、568nmの2重

50

(9)

特開2000-199855

15

励起に対してそれぞれの波長で励起される2つの蛍光色素が標本に染色されている場合は、図3(b)に示すように、励起波長に対応する微小ミラー素子26e、26gはこの位置に集光された光を光トラップ28へ偏向する。また、波長351nmで励起された蛍光はその波長に対応する微小ミラー素子26a、26f、26bにより光検出装置27aへ向けて反射される。波長568nmで励起された蛍光はその波長に対応する微小ミラー素子26c、26h、26dにより光検出装置27cへ向けて反射される。そして、検出装置27a、27cにおいてそれぞれの光強度が検出される。同様に、レーザー光源自体が変更された場合でも、微小ミラー素子26の偏向角度を適切に選択することで対応できる。

【0061】このように、励起波長、蛍光色素の様々な組み合わせに対し常に最適な分光が行えるのは、微小ミラー素子26が複数の光検出装置に選択的に光束を受光せしめる複数の反射角度を有し、且つ複数の反射角度の1つを任意に選択できるからに他ならない。かくして、本実施例の装置においては、光学フィルターを使用することなく、また高度な位置再現精度を要する機械駆動部を必要としない簡易な構成で、さらに、励起波長や蛍光色素の様々な組み合わせに対しても装置構成を変更することなく、多重染色された標本の多重励起蛍光像を高いS/Nをもって得ることができる。

【0062】以下、本実施例の走査型光学顕微鏡装置にかかる光学仕様および前記各条件式に関する数値を示す。

【0063】共焦点絞り11を通過した光束の絞りは対物レンズ7の切り換えで $NA_1 = 0.0044 \sim 0.011$ の間を変動する。

被検出光の最大波長 $\lambda_m = 700\text{nm}$

$\delta\lambda = 1.879\text{nm}$

コリメートレンズ22の焦点距離 $f_1 = 170\text{mm}$

集光レンズ24の焦点距離 $f_2 = 74\text{mm}$

$d = 11\mu\text{m}$

$\theta_m = 5^\circ$

$d/\delta\lambda = 11/1879 = 0.0059$

NA_1 が最も小さいとき

$(\lambda_m \cdot f_2) / (NA_1 \cdot \delta\lambda \cdot f_1) = 0.7 \cdot 74000 / (0.0044 \cdot 1879 \cdot 170000) = 0.37$

NA_1 が最も大きいとき

$(NA_1 \cdot f_1) / (f_2 \cdot \sin\theta_m) = 0.011 \cdot 170000 / (74000 \cdot 0.087) = 0.29$

【0064】第2実施例

図4は本実施例にかかる走査型光学顕微鏡装置の構成を示す図である。ここに示す本実施例の装置は、レーザー光源から共焦点絞りに至る光学的構成は第1実施例のものと同様なので省略する。

16

【0065】図4に示すように、本実施例の装置では、共焦点絞り11を通過した拡散光束をコリメートミラー32により平行光束とし、次いでグレーティング33と集光ミラー34によって波長情報を微小ミラー素子26の位置情報に変換しつつミラーアレイ25上に集光させる。コリメートミラー32および集光ミラー34は色収差の発生を考慮する必要がなく、コンパクトな構成が可能である。ここで、多重化された蛍光の分光は第1実施例と同様に行われるが、ミラーアレイ25とそれぞれの光検出装置27a~27dとの間に集光レンズ35a~35dを配置することで、ミラーアレイ25で反射した拡散光束を損失することなく光検出装置27a~27dへ導くことができる。

【0066】図5は前記集光レンズ35a~35dの変形例を示す図である。ここに示すように、前記集光レンズ35a~35dに代えて、光検出装置27a~27dへ向けて分光された光束をまとめて集光する集光レンズ36を配置しても同様の効果が得られる。なお、集光レンズ35a~35d、36は反射型集光素子等様々な集光素子の形態に置き換えることも可能である。

【0067】以下、本実施例の定査型光学顕微鏡装置にかかる光学仕様および前記各条件式に関する数値を示す。

【0068】共焦点絞り11を通過した光束の絞りは対物レンズ7の切り換えで $NA_1 = 0.002 \sim 0.011$ の間を変動する。

被検出光の最大波長 $\lambda_m = 1200\text{nm}$

$\delta\lambda = 1.63\text{nm}$

コリメートミラー32の焦点距離 $f_1 = 45\text{mm}$

集光ミラー34の焦点距離 $f_2 = 35\text{mm}$

$d = 100\mu\text{m}$

$\theta_m = 3^\circ$

$d/\delta\lambda = 100/1630 = 0.061$

NA_1 が最も小さいとき

$(\lambda_m \cdot f_2) / (NA_1 \cdot \delta\lambda \cdot f_1) = 1.2 \cdot 35000 / (0.002 \cdot 1630 \cdot 45000) = 0.29$

NA_1 が最も大きいとき

$(NA_1 \cdot f_1) / (f_2 \cdot \sin\theta_m) = 0.011 \cdot 45000 / (35000 \cdot 0.087) = 0.27$

【0069】第3実施例

図6は本実施例にかかる走査型光学顕微鏡装置の構成を示す図である。ここに示す実施例の装置は、レーザー光源から共焦点絞りに至る光学的構成は第1実施例のものと同様なので省略する。

【0070】図6に示すように、本実施例の装置では、共焦点絞り11を通過した拡散光束をコリメートレンズ22で平行光束とし、次いで、プリズム23と集光レンズ37によって波長情報を透過型微小光偏向素子39の位置情報に変換して、透過型微小光偏向素子アレイ38

(10)

特開2000-199855

17

上に集光させる。この透過型微小光偏向素子39は、シリコン等の透明で形状可変な光屈折素子の傾角度を変化させて、素子単位で透過する光の屈折方向を任意に変えられる微小な素子である。透過型微小光偏向素子39の光偏向方向は、透過型微小光偏向素子アレイ38が連続スペクトルを受ける軸40と略垂直な平面上にある。光検出装置27a~27dも軸40と略垂直な平面上に配置されている。各透過型微小光偏向素子39は、それぞれに入射した光束を光検出装置27a~27dへ向けて屈折させる光偏向角と光トラップ28へ向けて屈折させる光偏向角の計5つの選択可能な光偏向角度を有し、その角度選択は1素子単位で行うことができる。

【0071】多重化された蛍光の分光は、レーザー波長に対応する透過型微小光偏向素子39が入射光を光トラップ28へ向けて偏向し、且つ蛍光波長に対応する透過型微小光偏向素子39がその蛍光毎に別々の光検出装置27a~27dへ向けて偏向させることで達成され、各光検出装置でその強度が検出される。このように、本実施例の装置では、多重化される蛍光色素の数によらず1度の光の屈折のみによって分光が行われるため、光量損失を極めて少なくすることができる。

【0072】また、本実施例の装置では、特に光検出装置27a~27dが、集光レンズ37、透過型微小光偏向素子アレイ38を介して、光線が分解する前のプリズム23の位置と光学的に共役な位置に配置されている。したがって、透過型微小光偏向素子39の位置によらず透過型微小光偏向素子アレイ38で偏向される光束は、常に光検出装置27a~27dの何れかの中心へ向けられる。図6では光検出装置27aに光束を受光させる様子を示しているが、他の光検出装置27b~27dも軸40と略垂直である光検出装置27aと同一の平面上に配置されているため、どの透過型微小光偏向素子39を透過した光束も各光検出装置のほぼ中心に到達する。よって、本実施例の装置によれば、光検出装置の有効な受光面が小さな場合でも、様々なレーザー波長、蛍光色素に対応した最適な分光を光量損失なく行ない、S/Nのよい像を得ることができる。

【0073】以下、本実施例の走査型光学顕微鏡装置にかかる光学仕様および前記各条件式に関する数値を示す。

【0074】共焦点絞り11を通過した光束の絞りは対物レンズ7の切り換えで $NA_1 = 0.0044 \sim 0.011$ の間を変動する。

被検出光の最大波長 $\lambda_m = 1000 \text{ nm}$

$\delta\lambda = 3.21 \text{ nm}$

コリメートレンズ22の焦点距離 $f_1 = 150 \text{ mm}$

集光レンズ37の焦点距離 $f_2 = 100 \text{ mm}$

$d = 50 \mu\text{m}$

$\theta_m = 5^\circ$

$d/\delta\lambda = 50/3.21 = 0.015$

18

NA_1 が最も小さいとき

$$(\lambda_m \cdot f_2) / (NA_1 \cdot \delta\lambda \cdot f_1) = 1 \cdot 100000 / (0.0044 \cdot 3.210 \cdot 150000) = 0.047$$

NA_1 が最も大きいとき

$$(NA_1 \cdot f_1) / (f_2 \cdot \sin \theta_m) = 0.011 \cdot 170000 / (100000 \cdot 0.087) = 0.21$$

【0075】第4実施例

図7は本実施例にかかる走査型光学顕微鏡装置の構成を示す図である。ここに示す実施例の装置は、レーザー光源から共焦点絞りに至る光学的構成は第1実施例のものと同様なので省略する。また、省略された部分の各部材は図2に示した記号を用いて説明する。

【0076】本実施例の装置では、蛍光染色標本を測定する前に、マルチラインKr-Arアルゴンレーザー14からレーザービームを発振させ、標本8の位置に到達したレーザービームをカバーガラスの表面等で反射させ対物レンズ7から結像レンズ10までの光学系を介して共焦点絞り11を通過させる。この場合、必ずしも標本8の位置でレーザービームを反射させる必要はなく、何らかの手段でレーザービームが共焦点絞り11を通過するようにすればよい。その後、図7に示すように、レーザービームはコリメートレンズ22、プリズム23、集光レンズ24を経てミラーアレイ25上に集光される。ここで、各微小ミラー素子26に到達したレーザービームを端から順に光検出装置27aへ向けて反射させ、各微小ミラー素子26の位置とそこへ到達する光強度との関係を得る。図8はその一例を示すグラフである。横軸に微小ミラー素子26の位置、縦軸は光強度を表し、 L_1, L_2, L_3 はレーザー波長に対応する微小ミラー素子26の位置を示している。コントローラ29はこの結果を基に自動的に各微小ミラー素子26の角度を決定する。

【0077】図9は図8のグラフに示した結果にもとづいて図7に示したミラーアレイ25が分光を行う様子を示した図である。 L_1, L_2, L_3 の位置に対応する各微小ミラー素子はそこへ到達した光束をレーザートラップ28へ向け反射する。また、各微小ミラー素子26i, 26j, 26kはそれぞれ光検出装置27a, 27c, 27bへ向けて蛍光を反射させるように反射角が設定されている。なお、これら一連の操作はコントローラ29への簡単な指示のみで自動的に行われる。

【0078】以上により、本実施例の装置では、レーザー波長の経時変化や環境変化で生じた装置の誤差を容易に補正することができ、常に最高のS/Nをもって多量蛍光の検出が可能となる。また、レーザーの発振機構と前述した一連の操作を連動させれば、どのようなレーザーを使用した場合でも、前記の効果を有する自動化されたシステムが構築できる。

19

【0079】以下、本実施例の走査型光学顕微鏡装置にかかる光学仕様および前記各条件式に関する数値を示す。

【0080】共焦点絞り11を通過した光束の径がりは対物レンズ7の切り換えで $NA_1 = 0.0044 \sim 0.011$ の間を変動する。

被検出光の最大波長 $\lambda_m = 1000 \text{ nm}$

$\delta\lambda = 0.42 \text{ nm}$

コリメートレンズ22の焦点距離 $f_1 = 170 \text{ mm}$

集光レンズ24の焦点距離 $f_2 = 25 \text{ mm}$

$d = 50 \mu\text{m}$

$\theta_m = 5^\circ$

$d/\delta\lambda = 50/420 = 0.119$

NA_1 が最も小さいとき

$(\lambda_m \cdot f_1) / (NA_1 \cdot \delta\lambda \cdot f_1) = 1.250$
 $00 / (0.0044 \cdot 420 \cdot 170000) = 0.08$

NA_1 が最も大きいとき

$(NA_1 \cdot f_1) / (f_2 \cdot \sin \theta_m) = 0.011$
 $170000 / (25000 \cdot 0.087) = 0.8$

【0081】第5実施例

図10は本実施例にかかる走査型光学顕微鏡装置の構成を示す図である。ここに示す本実施例の装置は、レーザー光源からビームコリメートレンズ20に至る光学的構成は第1実施例のものと同様なので省略する。

【0082】図10に示すように、本実施例の装置では、ビームコリメートレンズ20で適切なビーム径を有する平行光束に変換されたレーザービームは、偏光板41によって直線偏光成分のみが透過される。直線偏光となったレーザービームは、光路分割ミラー49で反射されてガルバノメータミラー等のX-Y走査光学系5で偏向され、隠りレーンズ6、結像レンズ42を介してノマルスキープリズム43に入射する。ノマルスキープリズム43に入射したレーザービームは常光線、異常光線の2つの光束に分離された後、対物レンズ7を経て標本8上をレーザースポットとして走査される。標本8で反射されたレーザースポットは、対物レンズ7を介して再度ノマルスキープリズム43に入射する。この時、分離していた2つの光束（レーザービーム）は結合され、各光束の光路長差に依存する微分信号（微分情報）を有した光として光路分割ミラー49に至る経路をもどる。一方、レーザービームの照射により励起された標本8からの蛍光も、対物レンズ7から光路分割ミラー49までの経路をもどる。標本で反射したレーザービームと標本8から発せられる蛍光はともに光路分割ミラー49を透過して結像レンズ10で集光され、共焦点絞り11を通過する。共焦点絞り11を通りコリメートレンズ22で平行光化された光束はプリズム23及び集光レンズ24を経て波長毎にミラーアレイ25上に集光される。この

(11)

特開2000-199855

20

時、光束の波長情報はミラーアレイ25を形成する微小ミラー素子26の位置情報に変換されている。

【0083】ここで、微分干渉像として検出すべきレーザー波長のみを光検出装置27aへ向けて反射させ、他のレーザー波長に対応する微小ミラー素子26は入射光束をレーザートラップ28へ向けて反射させる。光検出装置27aへ向けて反射させられたレーザービームは、レーザービームの偏光方向に直交する偏光の方向で配置されている偏光板44を透過することにより微分干渉信号となり、光検出装置27aでその光量を検出され微分干渉像が得られる。同時に、蛍光波長に対応する微小ミラー素子26を蛍光波長別に光検出装置27b、27c、27dへ反射させて各光強度を検出する。これら微分干渉像、蛍光像は共に共焦点絞り11を通過させて得られているため光軸方向の分解能を有する。

【0084】このように、本実施例の装置では、多重蛍光像と微分干渉像を同時に、しかも共焦点像として得ることができ、それぞれの信号はお互いに完全に波長分離されたものであるためノイズの少ないS/Nの高い画像として検出可能である。また、偏光板が蛍光の通過する経路上に配置されていないので非常に明るい蛍光像が得られる。また、同じ装置を使って微分干渉検出1チャンネル、蛍光検出3チャンネルの状態から、蛍光4チャンネルの検出を行う場合を考える。ミラーアレイ25上に集光された光束のうちレーザービームは全てレーザートラップ28へ向けて偏向される一方、4つの蛍光はそれぞれ光検出装置27a、27b、27c、27dへ向けて反射される。この時、ミラーアレイ25と光検出装置27aとの間に配置された偏光板44は駆動部45によって蛍光の光路から外れるようになっており、微分干渉検出を行わない場合でも蛍光光量の損失を伴わない。

【0085】また、本実施例の変形例を図11に示す。ここに示す本実施例の装置は、レーザー光源からX-Y光走査光学系5に至る光学的構成及び、X-Y光走査光学系5から光検出装置27に至る光学的構成は第1実施例のものと同様なので省略する。

【0086】X-Y走査光学系5で偏向されたレーザービームは、隠りレーンズ6、結像レンズ42、対物レンズ7を介してλ/4板46に入射し直線偏光から円偏光に変換されて標本8上をレーザースポットとして走査される。ここで、標本8を封入しているカバーガラス47と標本8との間でレーザービームが干渉し、標本8の位相情報が干渉信号として検出される。標本8で反射した光束は再度λ/4板46を通過した後、入射レーザービームの偏光方向から直交する偏光として実施例5と同様の経路をたどり光検出装置27aでその光強度を所謂リフレクションコントラスト信号として検出される。この時、ミラーアレイ25と光検出装置27aとの間に配置された偏光板44は入射レーザービームの偏光方向と直交する偏光の方向で配置されている。よって、標本8

(12)

特開2000-199855

21

で反射した光束はそのまま検出される傍ら、レンズ表面で反射されたフレア光はこの偏光板44で遮断されることになる。標本8へ入射するレーザービームによって励起された蛍光は実施例5と同様にミラーアレイ25によって分離され各光検出装置27b、27c、27dでそれぞれの光強度を検出される。つまり、フレア除去後のリフレクションコントラスト像と同時に多重蛍光像が得られる。言うまでもなく本実施例も反射像と蛍光像はともに共焦点像として得られることになる。このように本実施例では、反射光検出で不可欠とされるフレア除去の構成をとる場合であっても、蛍光強度を全くロスすることなく、反射光と蛍光の同時観察が可能である。

【0087】第6実施例

図12は本実施例にかかる走査型光学顕微鏡装置の構成を示す図である。ここに示す本実施例の装置は、レーザー光源からミラーアレイ25に至る光学的構成は第1実施例のものと同様なので省略する。また、省略された部分の各部材は図2に示した記号を用いて説明する。

【0088】本実施例の装置では、蛍光染色された標本を測定する前にマルチラインK_r-Arレーザー14からレーザービームを発振させ、標本8の適当な部分に照射し、その反射光を対物レンズ7から集光レンズ24までの光学系を介してミラーアレイ25上に集光させる。ここで、各微小ミラー素子26は標本8で反射したレー

$$I_b = \alpha b \cdot I_a$$

という演算処理を演算装置48で行うことにより達成される。この処理は標本を走査しながらリアルタイムで逐次行うことが可能であり、更に画像同士の演算に比べ扱うデータ量が少ないので高価な演算装置を必要としない。

【0090】更に、本実施例では、上記ノイズ除去に必要なデータ αb をレーザー波長、対物レンズ、共焦点絞りの大きさなど装置状態の変化毎に取得しメモリー部30に格納しており、装置の状態に連動して適切な値を呼び出し、自動的にノイズ除去の演算を行うようにプログラムが演算部48に組み込まれている。更に、幾つかの標準的な標本、例えば、反射標本、弱散乱標本、強散乱標本を測定した場合の該データ αb を予め取得しメモリー部30に記憶させてあり、観察しようとする標本にあわせて、選択が可能になっている。

【0091】以上により、本実施例の装置によれば、ノイズ検出と蛍光検出とを同時に行うのでノイズ成分の時間的変動に非常に強いという特徴を有し、更に、周波数フィルタリングではなく正確にバックグラウンドノイズを見積って蛍光画像から除算する手法を用いることにより本来の蛍光画像を正確に再現することが可能である。また、演算に必要なデータ量が非常に少なく高速な処理が実現でき、更に上記のようなノイズ除去の演算処理の自動化により作業者への負担も軽減されるものである。

【0092】また、前記実施例6の変形例として、複数

22

* ザー光束を光検出装置27aに向けて偏向し、他の波長は全てレーザートラップ28へ向けて偏向するように角度設定を行う。標本8で反射したレーザー光束の強度は光検出装置27aで検出される一方、ミラーアレイ25の隙間や傷、エッジ部に入射したレーザー光束により発生した散乱光の強度は光検出装置27b~27dでそれぞれ検出される。各光検出装置27b~27dで得られた強度は、演算装置48を介して光検出装置毎の入出力特性を補正された後、光検出装置27aで得られたレーザー光束の強度と、各光検出装置27b~27dに入射する散乱光強度の比が計算され、対物レンズ、共焦点絞りの大きさ、レーザー波長等の測定条件と共にメモリー部30に記憶される。ここでこの比をそれぞれ αa 、 αb 、 αc とする。

【0089】上記の如く必要なデータを取得した後、以下の様にしてノイズ除去を行う。ミラーアレイ25上に波長分離された光束のうち、レーザー光束は光検出装置27aへ、蛍光は光検出装置27b~27dの何れかにそれぞれ向けられその光強度が検出される。ここで、本実施例の説明の為、蛍光強度を光検出装置27bで検出する場合を考える。光検出装置27a及び27bで検出された各光強度の値は光検出装置毎の入出力特性による補正がされる。補正後のそれぞれの強度を I_a 、 I_b と表記すると、蛍光像からのノイズ除去は、

$$\dots\dots(9)$$

のレーザー波長を用いた多重蛍光検出も同様に可能である。この場合、前記ミラーアレイ25で発生する散乱の度合いは波長により異なり、一般には短波長であるほど散乱光は強くなる傾向にある。この点を考慮するため、本実施例では各レーザー波長毎に前記実施例6と同様のデータを取得するとともに、光検出装置27aで検出される各レーザー波長の強度比を測定する。この測定結果を基に、光検出装置27aで得られる複数のレーザー波長が混合した状態の強度から、各レーザー波長単独の強度を算出し、その算出した強度に対して実施例6の方法を用いて予め求めておいた各々の波長毎に散乱度合いを反映した係数を乗算してその総和から、トータルの散乱光を見積もることが可能となる。このように、多重蛍光観察においても本発明のノイズ除去手段は有効であり、非常にクリアな蛍光像が得られる。

【0093】第7実施例

本実施例にかかる走査型光学顕微鏡装置の構成は第6実施例のものと同様なので省略する。また、省略された各部材は図12に示した記号を用いて説明する。本実施例では、光検出装置27b~27dで検出される蛍光像のバックグラウンドノイズの除去を次の条件式(5)に基づいて行っている。

$$I_{1,00} = I_{00} - (\alpha \cdot I_{00} + \beta \cdot I_{10}) \quad \dots\dots(5)$$

但し、 $I_{1,00}$ は励起光によるバックグラウンドノイズ除去後の蛍光強度、 I_{00} は光検出装置27bで検出された蛍

(13)

特開2000-199855

23

光強度、 I_{ex} は光検出装置27aによって検出されたレーザー波長の光強度、 I_{in} は前記標本へ入射するレーザービームの強度、 α 、 β は前記走査型光学顕微鏡の装置状態に依存するパラメータを示す。また、 I_{in} 、 I_{ex} 、 I_{in} はそれぞれ標本とレーザースポットの相対位置に依存する関数である。本実施例の説明は蛍光像を光検出装置27bで検出する場合のみについて行うが、他の光検出装置で蛍光像を得る場合でも同様の作業を行えばよい。

【0094】上記パラメータ α 、 β を得るためにまず、ミラーアレイ25に入射した光束のうちレーザービームのみを光検出装置27aへ向けて偏向させ、他の光束は*

$$I_{scatter} = (\alpha \cdot I_{ex} + \beta \cdot I_{in}) \quad \dots(10)$$

に代入して連立式を解くことによりパラメータ α 、 β を算出し、対物レンズ、レーザー波長、共焦点絞り径などの測定条件と共にメモリー部30へ記録する。

【0095】標本の蛍光検出を実際に行う場合には、ミラーアレイ25へ入射するレーザー波長を光検出装置27aへ、蛍光波長を光検出装置27bへ、それぞれ向けるように各微小ミラーの方向を変更する。標本へのレーザービーム照射により、 I_{ex} 、 I_{in} それぞれの光強度が各光検出装置で検出されると、光検出装置の入出力特性の補正が行われた後、演算装置48において前記式(5)に基づいてバックグラウンドノイズの除去処理が施される。この時利用されるパラメータ α 、 β は予め取得されメモリー部30に記憶させた値を測定状態に合わせて呼び出したものである。このノイズ除去処理は標本を走査しながらリアルタイムで逐次行うことが可能である。

【0096】以上により、本実施例の装置では、ノイズ検出と蛍光検出とを同時に行うのでノイズ成分の時間的変動に非常に強いという特徴を有し、更にバックグラウンドノイズとなる励起光の発生源を標本と、装置内部とに分けて精度良く見分け、蛍光信号から除去することで、非常にS/Nの優れた蛍光画像を得ることができる。

【0097】以上説明したように、本発明による走査型光学顕微鏡装置は特許請求の範囲に記載した特徴と併せ、以下の(1)～(16)に示すような特徴も備えている。

【0098】(1) レーザー光源と、このレーザー光源から出射されたレーザービームを標本上に集光する対物レンズと、集光されたレーザービームを前記標本に対して相対的に走査する走査手段と、前記標本から発する光を結像する結像光学系と、この結像光学系の焦点位置に配置された共焦点絞りと、この共焦点絞りを通った前記標本からの光を検出する複数の光検出装置とを備えたレーザー走査型光学顕微鏡装置において、前記共焦点絞りを通過した光束を空間的にスペクトル分解した後、スペクトル分解された光束を微小の波長幅毎に複数の光検出装置に受光せしめるように反射させ、多色染色された標

24

* レーザートラップ28へ向けて偏向させる。光検出装置27bで得られる光強度はミラーアレイ25入射したレーザービームの散乱光強度であり、上式(5)の右辺第2項($\alpha \cdot I_{ex} + \beta \cdot I_{in}$)と一致する。この光強度を $I_{scatter}$ とする。ここで、まず標本の無い状態でレーザービームを発振させ I_{ex} 、 I_{in} と共に $I_{scatter}$ を検出する。次いで、標本を置いてレーザービームを発振させ、同様に I_{ex} 、 I_{in} と共に $I_{scatter}$ を検出する。これら強度情報は検出されるとすぐに各光検出装置の入出力特性が線形になるように補正され、演算装置48に入力される。演算装置48ではこの測定値を次式

$$\dots(10)$$

本の蛍光波長域に応じて、光束を受光せしめる1つの光検出装置を任意に選択し得るようにしたことを特徴とする走査型光学顕微鏡装置。

【0099】(2) 前記共焦点絞りと前記スペクトル分解手段との間に、前記共焦点絞りを通過した光束を略平行光とするコリメートレンズと、前記スペクトル分解された光束の各スペクトル光を少なくともスペクトル分解の方向に集光させる集光光学系とを配置し、さらにその集光位置近傍に前記光偏向素子アレイを配置したことを特徴とする請求項1または前記(1)に記載の走査型光学顕微鏡装置。

【0100】(3) 前記微小光偏向素子アレイと前記複数の光検出装置との間に、少なくとも1つの正の屈折力を有する光学系を配置したことを特徴とする請求項1または前記(1)、(2)の何れかに記載の走査型光学顕微鏡装置。

【0101】(4) 前記微小光偏向素子アレイを形成する微小光偏向素子において、隣接する2つの微小光偏向素子は少なくとも1つの共通する前記光検出装置へ光束を受光せしめる偏向角を有していることを特徴とする請求項1または前記(1)乃至(3)の何れかに記載の走査型光学顕微鏡装置。

【0102】(5) 以下の条件式を満足することを特徴とする請求項2または前記(2)乃至(4)の何れかに記載の走査型光学顕微鏡装置。

$$(\lambda_m \cdot f_2) / (NA_1 \cdot \delta \lambda \cdot f_1) < 0.35$$

但し、 λ_m は検出光の最大波長、 f_2 は前記コリメートレンズの焦点距離、 f_1 は前記集光光学系の焦点距離、 NA_1 は前記共焦点絞りを通過して前記コリメートレンズへ入射する光束の開口数を示す。

【0103】(6) 以下の条件式を満足することを特徴とする請求項2または前記(2)乃至(5)の何れかに記載の走査型光学顕微鏡装置。

$$(NA_1 \cdot f_1) / (f_2 \cdot \sin \theta_m) < 1$$

但し、 λ_m は検出光の最大波長、 f_2 は前記コリメートレンズの焦点距離、 f_1 は前記集光光学系の焦点距離、 NA_1 は前記共焦点絞りを通過して前記コリメート

(14)

特開2000-199855

25

レンズへ入射する光束の開口数、 θ_m は前記微小光偏向素子が有する最小光偏向角度を示す。

【0104】(7) 前記各微小光偏向素子の角度を記憶するメモリ部と、レーザー波長、蛍光色素に対応する情報の入力を行う入力部と、それらの入力情報から記憶された各微小光偏向素子の光偏向状態を再現するコントローラ部とを備えたことを特徴とする請求項1、2または前記(1)乃至(6)の何れかに記載の走査型光学顕微鏡装置。

【0105】(8) 前記微小光偏向素子は微小ミラー素子であることを特徴とする請求項1乃至3または前記(1)乃至(7)の何れかに記載の走査型光学顕微鏡装置。

【0106】(9) 蛍光を検出すると共に前記複数の光検出装置のうちの少なくとも1つの光検出装置によって励起波長の光強度を検出するようにしたことを特徴とする請求項1乃至3の何れかに記載の走査型光学顕微鏡装置。

【0107】(10) 前記標本上に照射されるレーザービームを直線偏光とし、且つ前記微小光偏向素子アレイと前記励起波長の光強度を検出する光検出装置との間に偏光板を配置したことを特徴とする前記(9)に記載の走査型光学顕微鏡装置。

【0108】(11) 前記対物レンズと前記結像光学系との間にノマルスキープリズムを配置したことを特徴とする前記(10)に記載の走査型光学顕微鏡装置。

【0109】(12) 前記偏光板は励起波長の通過する光路へ容易に配置したことを特徴とする前記(10)または(11)に記載の走査型光学顕微鏡装置。

【0110】(13) 前記複数の光検出装置のうちの少なくとも1つの光検出装置によって検出された励起波長の光強度を基に、他の光検出装置で検出された蛍光の光強度から励起光によるバックグラウンドノイズを除去するようにしたことを特徴とする請求項1乃至3、または前記(9)乃至(12)の何れかに記載の走査型光学顕微鏡装置。

【0111】(14) 前記複数の光検出装置のうちの少なくとも1つの光検出装置によって検出された励起波長の光強度と、蛍光を検出するための光検出装置によって受光される励起波長の光強度との比率を予め取得し、この比率に基づいて、蛍光の光強度から励起光ノイズを除去するようにしたことを特徴とする前記(13)に記載の走査型光学顕微鏡装置。

【0112】(15) 以下の式に基づいて蛍光信号に混在した励起光によるバックグラウンドノイズを除去することを特徴とする前記(13)または(14)に記載の走査型光学顕微鏡装置。

$$I_{1n} = I_{11} - (\alpha \cdot I_{12} + \beta \cdot I_{13})$$

但し、 I_{1n} は励起光によるバックグラウンドノイズ除去後の蛍光強度、 I_{11} は検出された蛍光強度、 I_{12} は前記複数の光検出装置のうちの少なくとも1つの光検出装置によって検出された励起波長の光強度、 I_{13} は前記標本

26

へ入射するレーザービームの強度、 α 、 β は前記走査型光学顕微鏡の装置状態、標本状態に依存するパラメータを示す。

【0113】(16) 前記走査型光学顕微鏡の装置状態、標本状態毎に前記パラメータ α 、 β の最適な値を予め取得していることを特徴とする前記(15)に記載の走査型光学顕微鏡装置。

【0114】

【発明の効果】 上述のように、本発明によれば、光学フィルタを用いることなく、また高度な位置再現精度を要する機械駆動部を必要としない簡易な構成をもって、励起波長や蛍光色素の様々な組み合わせに対しても装置構成を変更することなく常に最適な分光を行い、蛍光光量の損失を著しく低減して、多量励起蛍光像を高いS/Nをもって得ることができる走査型光学顕微鏡装置を提供できる。また、本発明によれば、レーザー波長の経時変化や環境変化に対しても、煩雑な補正作業を伴わずに、常に最高のS/Nをもって多量蛍光の検出が可能である走査型光学顕微鏡装置を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の走査型光学顕微鏡装置における光学系の構成を説明するための図である。

【図2】 第1実施例にかかる走査型光学顕微鏡装置の構成を示す図である。

【図3】 (a)、(b)は図1に示した各微小ミラー素子の構成を示す図である。

【図4】 第2実施例にかかる走査型光学顕微鏡装置の構成を示す図である。

【図5】 図4に示した第2実施例の走査型光学顕微鏡装置の変形例を示す図である。

【図6】 第3実施例にかかる走査型光学顕微鏡装置の構成を示す図である。

【図7】 第4実施例にかかる走査型光学顕微鏡装置の構成を示す図である。

【図8】 第4実施例の走査型光学顕微鏡装置における微小ミラー素子の位置と光強度との関係を示すグラフである。

【図9】 図7に示したミラーアレイ25が分光を行う様子を示す図である。

【図10】 第5実施例にかかる走査型光学顕微鏡装置の構成を示す図である。

【図11】 図10に示した第5実施例の走査型光学顕微鏡装置の変形例を示す図である。

【図12】 第6、第7実施例にかかる走査型光学顕微鏡装置の構成を示す図である。

【図13】 従来の蛍光用レーザー走査型顕微鏡の構成を示す図である。

【符号の説明】

1a～1c レーザー発振器

2a、2b レーザー結合用ダイクロイックミラー

(15)

特開2000-199855

27

28

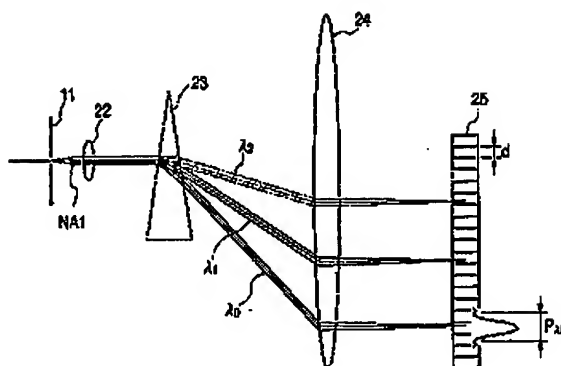
- 3 ビームエキスパンダー
- 4. 21 ダイクロイックミラー
- 5 X-Y定査光学系
- 6 離りレーンズ
- 7 対物レンズ
- 8 標本
- 9a. 9b 分光用ダイクロイックミラー
- 10. 10a~10c, 42 結像レンズ
- 11. 11a~11c 共焦点絞り
- 12a~12c 吸収フィルター
- 13a~13c 光検出器
- 14 マルチラインKr-Arレーザー
- 15 Arレーザー
- 16 レーザーラインフィルター
- 17 ファイバーカップリングレンズ
- 18 シングルモードファイバー
- 19 定査型光学顕微鏡本体
- 20 ビームコリメートレンズ
- 22 コリメートレンズ
- 23 プリズム
- 24. 35a~35d, 36, 37 集光レンズ
- 25 ミラーアレイ
- 26. 26a~26k 微小ミラー素子

* 27 a~27 d 光検出装置

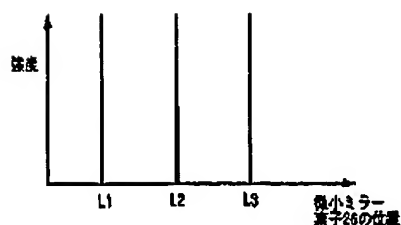
- 28 光トラップ
- 29 コントローラ
- 30 メモリー部
- 31 入力部
- 32 コリメートミラー
- 33 グレーティング
- 34 集光ミラー
- 38 透過型微小光偏向素子
- 39 透過型微小光偏向素子アレイ
- 40 軸
- 41. 44 偏光板
- 43 ノマルスキープリズム
- 45 駆動部
- 46 $\lambda/4$ 板
- 47 カバーガラス
- 48 演算装置
- 49 光路分割ミラー
- $\lambda_1 \sim \lambda_n$ 光束
- 20 d 微小ミラー素子のスペクトル分離方向の大きさ
- NA_1 コリメートレンズへ入射する光束の開口数
- $P(\lambda_0)$ スポット径

*

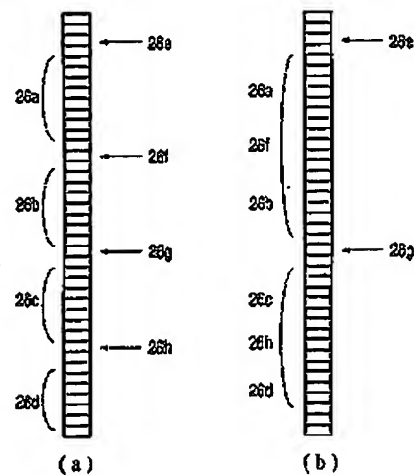
【図1】



【図8】



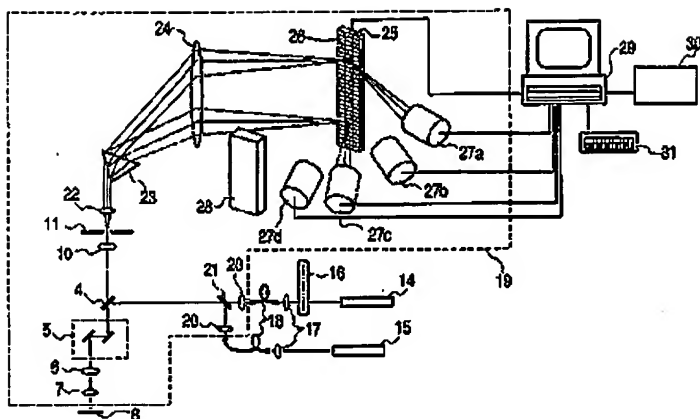
【図3】



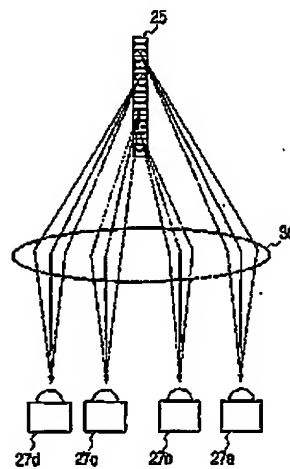
(16)

特開2000-199855

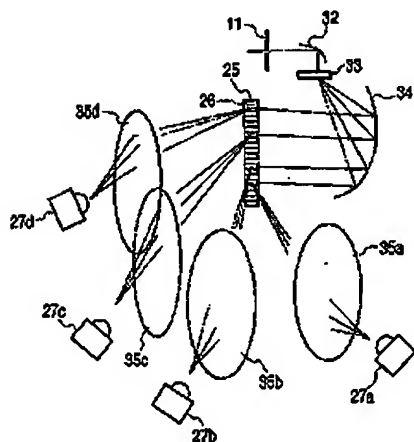
【図2】



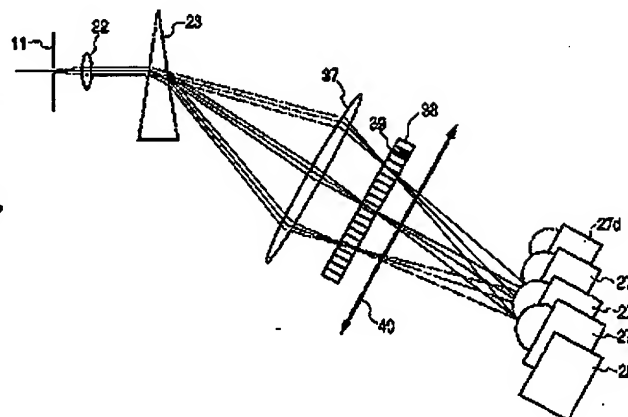
【図5】



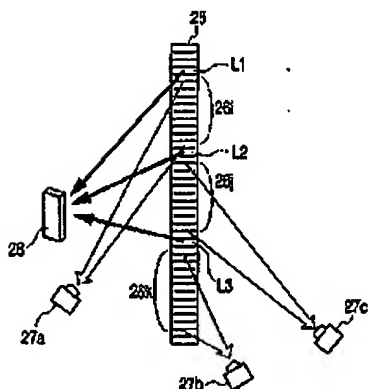
【図4】



【図6】



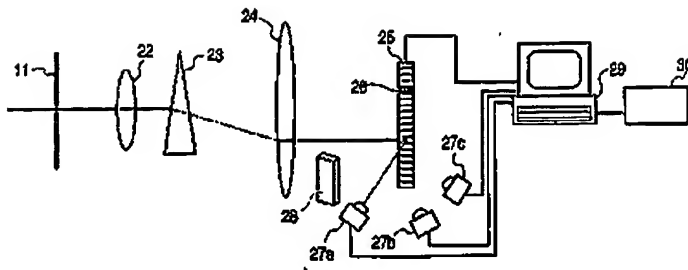
【図9】



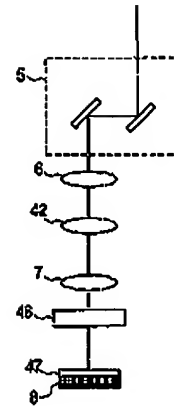
(17)

特開2000-199855

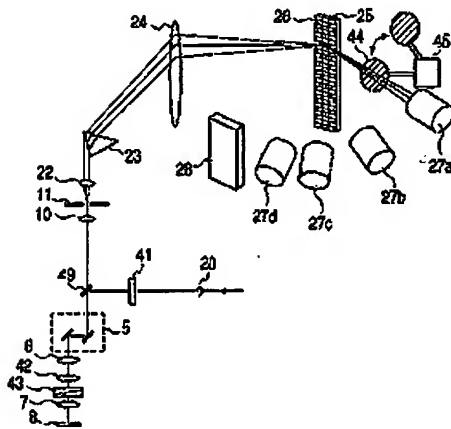
【図7】



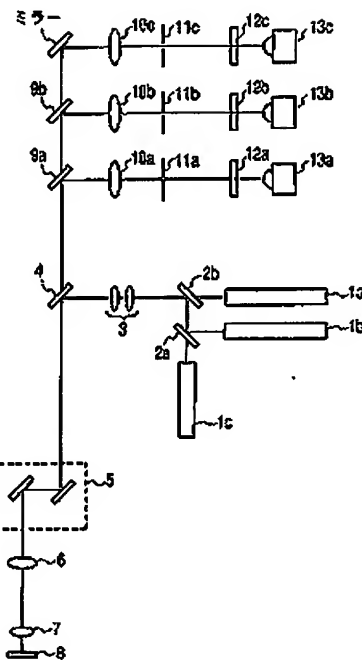
【図11】



【図10】



【図13】



【図12】

